

Peningkatan Resistensi Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin Menggunakan Metode Adaptif Gradual

Agustina Setiawati

ABSTRACT : Antibiotic resistance is recognized as scientific curiosity in infection disease treatment. Inappropriate using of antibiotic in infection disease treatment increases antibiotic resistance case. This research developed method to construct amoxicillin resistant of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Further, this culture can be used as a model of adaptive resistant bacteria in microbiology researches. This study used gradual-adaptive method by incubated bacteria in sub MIC amoxicillin-contained medium. Sub MIC amoxicillin concentration was increased every week for three weeks. The MIC was re-checked after each sub-MIC incubation. Amoxicillin had MIC 0.25 µg/mL against *S. aureus* and for gradual-adaptive method used 0.10; 0.15 and 0.20 µg/mL amoxicillin. This method increased MIC up to 300 fold after 0.10 µg/mL and 400 fold after 0.15 µg/mL but the MIC did not increase after 0.20 µg/mL amoxicillin sub culture. Gradual-adaptive method was success to develop *S. aureus* resistant to amoxicillin.

Keywords: resistance, *S. aureus*, gradual adaptive

ABSTRAK : Resistensi antibiotik masih menjadi perhatian dalam pengobatan penyakit infeksi. Penggunaan antibiotik yang tidak sesuai meningkatkan kasus terjadinya resistensi antibiotik. Penelitian ini didesain untuk membuat metode yang dapat digunakan untuk membuat kultur *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) yang resisten terhadap amoxicillin. Selanjutnya, bakteri tersebut dapat digunakan sebagai model bakteri resisten adaptif dalam penelitian mikrobiologi. Penelitian ini menggunakan metode adaptif gradual dengan sub kultur bakteri pada media mengandung amoxicillin sub-MIC. Konsentrasi sub-MIC ditingkatkan setiap minggu selama tiga minggu. MIC amoxicillin diuji kembali setiap akhir sub kultur sub-MIC pada satu konsentrasi. Amoxicillin bersifat bakterisidal terhadap *S. aureus* dengan MIC 0,25 µg/mL. Konsentrasi amoxicillin sub MIC yang digunakan adalah 0,10; 0,15 dan 0,20 µg/mL. Metode ini berhasil membuat *S. aureus* resisten dengan meningkatkan MIC 300x pada akhir sub kultur 0,10 µg/mL dan meningkatkan MIC 400x pada akhir sub kultur 0,15 µg/mL MIC tidak meningkat. Metode adaptif gradual berhasil meningkatkan resistensi *S. aureus* terhadap amoxicillin.

Kata kunci: resistensi, *S. aureus*, adaptif gradual

Laboratory of Pharmacy
and Phyttochemistry,
Faculty of Pharmacy, Sanata Dharma
University Yogyakarta

Korespondensi:

Agustiana Setiawati
Email: agustinasetiawati85@gmail.com

PENDAHULUAN

Kasus resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi suatu masalah serius dalam dunia kesehatan. Data *Cancer for Disease Prevention* menyebutkan bahwa 13.300 pasien meninggal akibat infeksi bakteri yang resisten (1). Peningkatan kasus resistensi bakteri tidak dimbangi dengan penemuan antibiotik baru (2). Salah satu kasus peningkatan infeksi disebabkan oleh patogen oportunistik *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). *S. aureus* dapat menimbulkan penyakit infeksi serius antara lain septikemia, pneumonia, endokarditis, osteomielitis, gastroenteritis dan abses (3). Tingkat infeksi *S. aureus* terus meningkat dekade terakhir dan berkembang permasalahan resistensi antibiotik dalam pengobatan infeksi *S. aureus* (4).

Amoxicillin, turunan penisilin, antibiotik golongan β -laktam yang sering digunakan pada kasus infeksi *S. aureus* karena absorpsi per oral yang baik. Penisilin sangat efektif untuk infeksi *Staphylococcus* dan telah digunakan dalam pengobatan sejak tahun 1940-an (5), setelah itu tahun 1942 mulai ditemukan kasus resistensi *S. aureus* di rumah sakit. Prevalensi tersebut meningkat dengan ditemukannya *S. aureus* yang menghasilkan penisilinase (6). Resistensi *S. aureus* terhadap methicillin (golongan penisilin), kemudian disebut *Methicillin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) terkait dengan plasmid yang membawa gen *blaZ* yang menyandi β -laktamase. Selain itu, resistensi *S. aureus* juga dipengaruhi oleh ekspresi *Penicillin Binding Protein 2a* (PBP-2a) yang mengefluks golongan penisilin keluar sel (7). Kasus resistensi *S. aureus* terhadap golongan penisilin terjadi pada lebih dari 86% kasus (8). Kasus resistensi inilah yang menyebabkan kegagalan terapi menggunakan amoxicillin pada infeksi *S. aureus*. Oleh karena itu, penelitian untuk mengatasi permasalahan resistensi ini penting dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kultur *S. aureus* yang resisten terhadap amoxicillin. Penelitian ini didesain berdasarkan mun-

culnya kasus resistensi yang disebabkan oleh ketidaktuntasan terapi antibiotik pada pasien infeksi atau peresepan antibiotik yang tidak sesuai dengan petunjuk terapi (9). Pada negara berkembang, antibiotik digunakan tanpa resep atau diresepkan tidak sesuai dengan petunjuk terapi oleh dokter (10). Peningkatan resistensi kultur *S. aureus* amoxicillin menggunakan metode adaptif gradual dilakukan dengan menginkubasi kultur *S. aureus* dalam media yang mengandung amoxicillin konsentrasi sub MIC secara berulang. Kultur *S. aureus* yang dihasilkan dapat digunakan untuk subyek uji penelitian skrining senyawa untuk mengatasi masalah resistensi adaptif.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Serbuk amoxicillin injeksi (Phapros), kultur bakteri *S. aureus* ATCC25923 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, Muller Hinton Agar (MHA) (Merck), Muller Hinton Broth (MHB) (Merck), *Water for Irrigation* (Otsuka), larutan standar McFarland II (konsentrasi mikroba 6.10^8 CFU/mL), alkohol 70% (Bratachem), aquadest.

Alat

Vortex (Scientific Industries®), autoklaf (Omron®), mikropipet (Scorex®), pelubang sumuran (), cawan petri (Pyrex), shaker, pemanas, jangka sorong, blue tip (Axygen®), yellow tip (Axygen®).

Metode

1. Pengujian dan penentuan MIC dan MBC dengan metode dilusi padat

Sebanyak 1 mL suspensi bakteri *S. aureus* diinokulasikan secara *pour plate* pada 15 mL media MHA. Kultur diinkubasi selama 24 jam, kekeruhan media diamati. Media yang pertumbuhan bakterinya sangat keruh diberi notasi (+++), media yang keruh (++) , agak keruh (+), dan jernih (-). Kekeruhan masing-masing

dibandingkan dengan kontrol pertumbuhan dan kontrol media. Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan melakukan *streak plate* dari hasil uji aktifitas antibakteri secara dilusi padat. Hasil uji yang digunakan adalah media yang bernotasi (-) atau yang memberikan kejernihan secara visual. MIC adalah konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, ditandai dengan *S. aureus* yang masih dapat tumbuh pada hasil *streak plate*, sedangkan MBC adalah konsentrasi terkecil yang dapat membunuh bakteri ditandai dengan *S. aureus* yang tidak dapat tumbuh pada hasil *streak plate*, yang menandakan bakteri uji mati karena larutan uji dengan konsentrasi tersebut.

2. Perlakuan adaptif gradual amoxicillin pada kultur *S. aureus*

Larutan amoxicillin stok ditambahkan media MHB hingga konsentrasi akhir dibawah MIC amoxicillin terhadap bakteri *S. aureus* dalam 10 mL. Masukkan 1 mL suspensi bakteri stok, goyang hingga merata. Setelah inkubasi 1x24 jam, ambil 1 mL suspensi bakteri masukkan ke dalam media MHB yang mengandung amoxicillin di bawah konsentrasi MIC.

Kultur bakteri tersebut diinkubasi 1x24 jam kemudian disub kultur ke dalam media MHB baru. Perlakuan ini diulang dengan menggunakan media MHB dengan konsentrasi di bawah MIC yang sama hingga 1 minggu. Sub kultur ulang bakteri dengan cara yang sama menggunakan konsentrasi amoxicillin ditingkatkan selama 2 minggu dengan peningkatan konsentrasi amoxicillin setiap minggu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

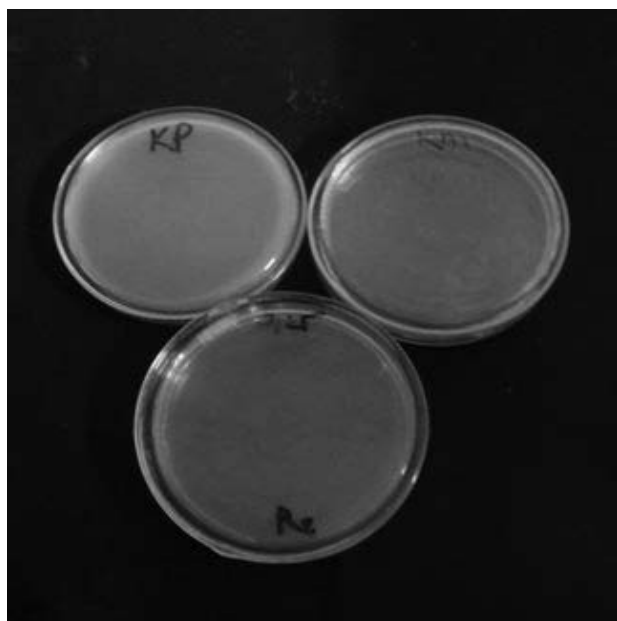
Peningkatan resistensi kultur bakteri *S. aureus* terhadap amoxicillin diawali dengan penentuan *Minimum Inhibition Concentration* (MIC) amoxicillin terhadap kultur murni *S. aureus*. Kultur murni bakteri yang digunakan adalah *S. aureus* ATCC 25923. Penentuan MIC menggunakan metode dilusi padat menggunakan medium MHA yang mengandung antibiotik berbagai konsentrasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kultur murni *S. aureus* sudah resisten terhadap amoxicillin dengan MIC 0,25 µg/mL. *S. aureus* yang sensitif terhadap amoxicillin mempunyai kadar MIC ≤ 0,12 µg/mL sedangkan yang resisten mempunyai kadar MIC ≥ 0,25 µg/mL (11).

Tabel 1. Penentuan MIC Amoxicillin terhadap *S. aureus* dengan Metode Dilusi Padat

Perlakuan	I	II	III
Kontrol pertumbuhan	+++	+++	+++
Kontrol media	-	-	-
Konsentrasi 0,10 µg/mL	+++	+++	+++
Konsentrasi 0,25 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 0,50 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 1,00 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 1,25 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 1,50 µg/mL	-	-	-

Keterangan:

+++ : media sangat keruh
 ++ : media kekeruhan sedang
 + : media sangat keruh
 - : media jernih



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri pada kontrol pertumbuhan (KP), kontrol media (KM) dan amoxicillin pada kadar MIC 0,25µg/mL.

Amoxicillin merupakan antibiotik bakteri-sidal dan spektrum luas yang menghambat sintesis dinding sel selama sel membelah. Amoxicillin terikat pada protein membran, *penicillin binding protein* 1A (PBP-1A) yang terletak dalam dinding sel. Amoxicillin mengasilasi enzim transpeptidase yang berperan membentuk ikatan silang antar peptidoglikan pada pembentukan dinding sel sehingga sel bakteri mati akibat lisis (12).

Metode adaptif gradual merupakan metode peningkatan resistensi bakteri dengan cara mengadaptasikan kultur bakteri dalam medium yang mengandung antibiotik konsentrasi sub MIC secara berulang-ulang. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi amoxicillin 0,10; 0,15 dan 0,20 µg/mL untuk sub kultur bakteri *S. aureus*. Perlakuan sub kultur dilakukan selama 1 (satu) minggu untuk masing-masing konsentrasi. Peningkatan resistensi ditunjukkan melalui peningkatan MIC amoxicillin terhadap *S. aureus*.

Tabel 2. Penentuan MIC Amoxicilin terhadap *S. aureus* dengan Metode Dilusi Padat setelah Sub Kultur 0,10µg/mL

Perlakuan	I	II	III
Kontrol pertumbuhan	+++	+++	+++
Kontrol media	-	-	-
Konsentrasi 50 µg/mL	+++	+++	+
Konsentrasi 75 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 100 µg/mL	-	-	-

Tabel 3. Penentuan MIC Amoxicilin terhadap *S. aureus* dengan Metode Dilusi Padat setelah Sub Kultur 0,15 µg/mL

Perlakuan	I	II	III
Kontrol pertumbuhan	++++	++++	+++
Kontrol media	-	-	-
Konsentrasi 50 µg/mL	++	+	++
Konsentrasi 100 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 500 µg/mL	-	-	-

Tabel 4. Penentuan MIC Amoxicilin terhadap *S.a ureus* dengan Metode Dilusi Padat setelah Sub Kultur 0,20µg/mL

Perlakuan	I	II	III
Kontrol pertumbuhan	++++	++++	+++
Kontrol media	-	-	-
Konsentrasi 50 µg/mL	++	+	++
Konsentrasi 100 µg/mL	-	-	-
Konsentrasi 200 µg/mL	-	-	-

Hasil di atas menunjukkan bahwa metode adaptif gradual dapat meningkatkan resistensi bakteri *S. aureus* terhadap antibiotik amoxicillin. Pada akhir perlakuan sub kultur pada media yang mengandung amoxicillin 0,10 µg/mL, MIC amoxicillin meningkat dari 0,25 µg/mL menjadi 75 µg/mL (meningkat 300x lipat) (Tabel II). Sub kultur berikutnya pada media yang mengandung amoxicillin 0,15 µg/mL, meningkatkan MIC amoxicillin terhadap bakteri menjadi 100 µg/mL (meningkat 400x lipat) (Tabel III). Perlakuan sub kultur berikutnya pada media yang mengandung amoxicillin 0,20 µg/mL tidak menyebabkan MIC 100 µg/mL mengalami peningkatan.

Mekanisme molekuler peningkatan resistensi adaptif pada bakteri *S. aureus* dalam penelitian ini belum dapat diketahui secara pasti. Resistensi *S. aureus* terhadap amoxicillin dapat diperantarai oleh penurunan jumlah *Penicilline Binding Protein* (PBP-1A) yang dihasilkan oleh bakteri atau penurunan afinitas amoxicillin pada *Peni-*

cilline Binding Protein(13). menyebutkan bahwa resistensi adaptif bakteri dapat disebabkan oleh aktivasi jalur molekuler tertentu dalam sel bakteri. Mekanisme molekuler dan faktor terkait resistensi adaptif perlu diteliti lebih lanjut melalui karakterisasi gen marker yang berperan dalam resistensi *S. aureus*. Ekspresi gen marker tersebut dapat dilakukan untuk mengetahui regulasi ekspresi gen marker tersebut dalam *S. aureus* yang resisten.

KESIMPULAN

Metode adaptif gradual dapat meningkatkan resistensi bakteri *S. aureus*

SARAN

Dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui mekanisme molekuler terjadinya resistensi adaptif pada *S. aureus* terhadap amoxicillin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K. Antibiotic Resistance of Bacteria: A Global Challenge, 2012. 17(2): 177-191.
2. Fischbach, M.A. Walsh, T. Antibiotics for Emerging Pathogen. *Science*. 2009. 325(5944): 1089- 1093.
3. Bernardo, WLC., Boriollo, MFG. Goncalves, R.B. Hofling, JF. *Staphylococcus aureus* Ampicillin-Resistant from the Odontological Clinic Environment. *Rev.Inst.Med.Trop.S. Paulo*, 2005. 47(1): 19- 24.
4. Huttner A., Harbarth, S., Carlet J., Cosgrove, S., Goossens, H., Holmes, A. et al. Antimicrobial resistance: a Global View from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2013. 2: 31
5. Appelbaum, P.C. Microbiology resistance in *Staphylococcus aureus*. *CID Supplement* 3. 2007. 45: S166-S170.
6. DeLeo, F.R. and Chambers H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics area. 2009. 119(9): 2464- 2474.
7. Lencastre, H., Oliveira, D. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. 2007. *Curr Opin Microbiol*. 10(5): 428- 435.
8. Shituu, A.O., Okon, K., Adesida, S., Oyedara, O., Witte, W., Strommenger, B., Lauer, F., Nubel, U. Antibiotic Resistance and Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria, *BMC Microbiology*, 2011. 11: 92
9. WHO, 2001. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, Switzerland:5
10. Laxminarayan R. Duse, A, Wattal, C. Antibiotic Resistance-the need for global solution. *Lancet Infect Dis*. 2013. S1473-3099(13): 70318-9.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement. 2007. 27(1): M100- S17.
12. Kaur, S.P, Rao, R., Nanda, S. Amoxicillin: A Broad Spectrum Antibiotic. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011. 3(3): 30- 37.
13. Opal, S.M., Vicas, V.P. Molecular Mechanism of Antibiotic Resistance in Bacteria. Basic Principles in the Diagnostic and Management of Infectious Diseases. 2005. 279- 295.